

O Modelo do Ligante Biótico e suas Aplicações em Ecotoxicologia

Prof. Dr. Adalto Bianchini

Dra. Samantha Eslava Martins

MSc. Marianna Basso Jorge

Julho 2009

PREFÁCIO

O Modelo do Ligante Biótico (BLM) é uma importante ferramenta para a avaliação de riscos ecológicos da emissão de metais nos ambientes aquáticos. Ao longo dos últimos anos, o BLM tem sido proposto como uma ferramenta para demonstrar, quantitativamente, o modo como a química da água afeta a especiação e a biodisponibilidade de metais em sistemas aquáticos, bem como para avaliar os potenciais riscos toxicológicos.

Uma vez que os processos que ocorrem nos compartimentos aquáticos são fundamentais para determinar a biodisponibilidade dos metais, e conseqüentemente sua toxicidade para os organismos, a comunidade científica e as agências regulatórias ao redor do mundo tem despertado interesse cada vez maior pelo BLM, em função do potencial que este modelo apresenta para a determinação de padrões de qualidade de água e procedimentos de avaliação de risco ecológico sítio-específicos.

A aplicação do BLM para ambientes dulcícolas tem sido reconhecida em escala mundial e é crescente a inserção de aspectos da modelagem, em especial do BLM, no âmbito da regulamentação da emissão de metais em ambientes aquáticos.

No Brasil, ainda são restritos os grupos de pesquisa que desenvolvem e executam projetos com o objetivo de validar uma versão do BLM para ser aplicado em águas do Território Nacional e, conseqüentemente, auxiliar as Instituições de Regulamentação Ambiental a adotarem ou refinarem padrões de qualidade de água com base nas diferentes características dos corpos d'água.

Considerando a grande importância e aceitação deste modelo em âmbito mundial, o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA), apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), está promovendo o curso de capacitação intitulado "O Modelo do Ligante Biótico (BLM) e suas aplicações em Ecotoxicologia". O objetivo deste curso é divulgar o BLM como uma importante ferramenta com grande potencial para utilização em águas do território brasileiro.

INDICE

1. Conceitos em Ecotoxicologia.....	4
2. A emissão de metais em ambientes aquáticos e sua problemática	5
3. Parâmetros físico-químicos da água e sua influência na especiação e biodisponibilidade de metais	7
4. Biodisponibilidade e toxicidade de metais para os organismos aquáticos.....	9
<i>4.1 Testes de Toxicidade.....</i>	<i>15</i>
5. O Modelo do Ligante Biótico (BLM)	16
<i>5.1 Origem e Contexto Histórico do BLM.....</i>	<i>16</i>
<i>5.2 Bases Técnicas do Modelo do Ligante Biótico</i>	<i>20</i>
6. Aplicações do BLM em Ecotoxicologia	22
7. Limitação do BLM e uso de modelos alternativos	24
8. Bibliografia Consultada.....	28

1. Conceitos em Ecotoxicologia

O uso de testes ecotoxicológicos integra conceitos da ecologia, no que diz respeito a diversidade e representatividade dos organismos e seus significados ecológicos nos ecossistemas, e da toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas. Embora sejam duas ciências com estruturas e direcionamentos distintos, ambas estão ligadas à problemática da poluição ambiental.

Desta forma, ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos (animais ou vegetais), em nível organísmico, populacional e de comunidades, nos ambientes terrestre e aquático. Portanto, esta ciência avalia, de forma integrada, a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem.

Dentre os focos da ecotoxicologia, podemos abordar os estudos em três níveis principais:

1. Estudos da emissão, entrada, distribuição e destino dos poluentes nos diferentes compartimentos abióticos;
2. Estudo da entrada e destino dos poluentes nas cadeias biológicas e suas formas de transferência na cadeia trófica;
3. Estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos tóxicos dos poluentes ao ecossistema, incluindo o homem.

Como a maioria das outras ciências, a ecotoxicologia aborda aspectos fundamentais de outras disciplinas. Assim, permite avaliar os danos ocorridos nos diversos ecossistemas após contaminação e também prever impactos futuros, quando da comercialização de produtos químicos e/ou lançamentos de despejos num determinado ambiente. Para tanto, esta ciência exige uma boa compreensão das noções fundamentais de ecologia, biologia, química, bioquímica, fisiologia, estatística, oceanografia, limnologia, dentre outras. Análises estatísticas e modelagem matemática têm sido utilizadas como ferramentas importantes para quantificar e prever os efeitos biológicos e determinar sua probabilidade de ocorrência sob diferentes condições ambientais.

As propriedades inerentes dos agentes químicos, tais como transformação no ambiente, potencialidade de bioacumulação, persistência e concentração ambiental ou dose administrada, assim como os processos metabólicos dos organismos (absorção, distribuição, excreção e mecanismo de detoxificação), determinam o efeito específico de um contaminante num determinado alvo (órgão, indivíduo, população ou comunidade). Os efeitos adversos dos

poluentes sobre os organismos vivos podem ser quantificados por uma variedade de critérios, tais como: número de organismos mortos ou vivos, taxa de reprodução, variação no comprimento e massa corpórea, número de anomalias ou incidência de tumores, alterações fisiológicas, alterações na densidade e diversidade de espécies numa determinada comunidade biológica, dentre outros.

2. A emissão de metais em ambientes aquáticos e sua problemática

A aparente infinidade dos recursos naturais fomentou, por séculos, uma tradicional tranqüilidade a respeito da poluição e despejos de dejetos tóxicos no ambiente. No entanto, o desenvolvimento urbano acelerado de forma desordenada, tem provocado um intenso povoamento das margens e bacias de drenagem dos sistemas continentais, tornando-os vulneráveis e sujeitos ao surgimento de problemas ambientais.

Surge então uma preocupação mundial com a preservação dos recursos naturais e com os possíveis efeitos nocivos que resultam da contaminação do ar, solo e água. Nesse contexto, um dos principais focos de atenção são os recursos hídricos, que vêm sendo utilizados de forma acelerada pelo homem. A industrialização, os processos de exploração turística e a agricultura são exemplos de intervenções que têm promovido modificações na distribuição, quantidade e qualidade das águas. Isso representa uma ameaça à sobrevivência da humanidade e das demais espécies que habitam o planeta.

As atividades mencionadas acima são responsáveis pela variedade e quantidade de substâncias químicas que ingressam nos ambientes aquáticos. A introdução de efluentes em rios e estuários, especialmente aqueles localizados em regiões influenciadas por centros industriais e urbanos, tem levado a um aumento significativo na contaminação em geral, tanto por compostos orgânicos, como hidrocarbonetos e pesticidas, quanto por compostos inorgânicos, como substâncias radiativas e metais. Geralmente, os níveis dos compostos químicos são avaliados considerando seus efeitos danosos aos organismos aquáticos. Sendo que, atualmente, o maior desafio da toxicologia aquática é desenvolver habilidades de prognosticar a taxa e a extensão da poluição química, bem como seus efeitos biológicos.

Dentre os agentes químicos contaminantes, os metais são os mais representativos. Os metais são por definição bons condutores de eletricidade, sendo que sua condutividade elétrica decresce com a temperatura. Diferenciam-se assim dos não-metais, os quais não são bons condutores elétricos. Por sua vez, diferenciam-se dos metalóides (B, Si, Ge, As, Te), uma vez que estes têm condutividade elétrica baixa, a qual aumenta com a temperatura.

A maior preocupação da presença de metais no ambiente aquático está associada à sua persistência e toxicidade. Devido à sua persistência no ambiente, os metais participam nos ciclos biogeoquímicos globais, nos quais a água é o principal vetor de distribuição.

No que se refere à toxicidade de metais, esta é variável e depende das características de cada elemento, sua disponibilidade para incorporação biológica, concentração e forma química. Além disso, deve ser considerada a sua essencialidade em processos metabólicos ao longo da vida do organismo. Portanto, para melhor compreensão do comportamento dos metais e sua toxicidade serão abordadas inicialmente as fontes de emissão e a distribuição destes elementos no ambiente aquático. Devido ao maior número de informações disponíveis para o cobre, zinco, cádmio e prata, estes serão os principais metais abordados ao longo do presente curso.

Sabe-se que uma das principais fontes de liberação de metais nos ambientes aquáticos são os processos naturais, tais como vento, erosão continental, intemperismo das rochas, fontes hidrotermais e remobilização diagenética, sendo que os rios representam as principais vias de distribuição de metais, tanto sob as formas particulada quanto dissolvida. No entanto, atividades antropogênicas como mineração, queima de combustíveis fósseis e despejo de dejetos são cada vez mais responsáveis pelo aumento dos níveis de metais nestes ambientes. O cobre, por exemplo, é um metal de transição que pode ser encontrado em diversos minerais. Este metal apresenta alta condutibilidade elétrica e térmica. Sua aplicação é, por excelência, como material condutor (fios e cabos), mas pode ser utilizado também em tubos de encanamentos, motores elétricos, interruptores, entre outros. O sulfato de cobre é um composto de grande importância industrial, sendo empregado na agricultura, na purificação da água e como conservante de madeira. Além disso, foi muito utilizado como algicida em reservatórios de abastecimento de água para o controle de microalgas e cianobactérias, as quais são responsáveis pelo odor e toxinas presentes nessas águas.

Por sua vez, as ligas metálicas de zinco têm sido utilizadas durante séculos. Peças de latão datadas de 1000-1400 a.C. foram encontradas na Palestina e outros objetos, com até 87% de zinco, foram encontrados na antiga região da Transilvânia. A principal aplicação do zinco, responsável por cerca de 50% do consumo anual, é na galvanização do aço ou ferro, visando proteção contra corrosão. Ele também pode ser usado, na forma de óxido, em protetores solares, pois tem a capacidade de bloquear a incidência da radiação solar.

Quanto ao cádmio, este é muito similar ao zinco em estrutura atômica e comportamento químico e, por isso, ambos costumam ocorrer juntos na natureza. O cádmio é usado em inúmeros processos industriais, sendo a galvanoplastia o mais conhecido. O cádmio

também é constituinte de ligas de fusíveis e soldas de alumínio. É ainda utilizado em amálgamas dentários e em baterias, juntamente com o níquel.

A prata é encontrada pura ou associada a cobre, ouro e chumbo. Este metal está presente em ligas metálicas de alumínio, cádmio, cobre e chumbo, o que aumenta sua força, dureza e resistência à corrosão. Este metal é também amplamente utilizado em utensílios de mesa e joalheria. Os compostos de prata foram intensivamente usados como agentes antimicrobianos no tratamento de queimaduras e em infecções oculares. Atualmente, a principal fonte de prata para o ambiente é a indústria fotográfica.

Uma vez no ambiente aquático, os metais podem se apresentar na forma particulada e/ou dissolvida, distribuindo-se por diferentes compartimentos através de vários processos, tais como: 1) interações iônicas simples; 2) associação com partículas; 3) nucleação e aglomeração; 4) oxidações e reduções químicas e biológicas; 5) complexação com ligantes; 6) adsorção e absorção por microorganismos. De maneira geral, podemos dividir os compartimentos ambientais em bióticos e abióticos, sendo que os mesmos estão sempre correlacionados.

Uma vez que o metal atinge um corpo de água, uma série de reações químicas pode ocorrer. Portanto, este metal pode se apresentar sob uma variedade de formas no ambiente aquático. O processo que determina as formas em que os metais serão encontrados no ambiente é conhecido como **especiação**. As espécies metálicas resultantes dos processos de especiação determinam a sua disponibilidade para a biota aquática. Dependendo do nível de exposição, o metal incorporado pela biota pode apresentar efeitos benéficos ou ser prejudicial aos organismos.

Assim sendo, a compreensão do comportamento e mobilidade dos metais nos diversos compartimentos do ambiente depende muito de sua especiação. As diferentes formas químicas obedecem a uma determinada distribuição nos compartimentos da natureza. Por exemplo, compostos metálicos sólidos têm menor mobilidade que compostos coloidais ou solúveis.

3. Parâmetros físico-químicos da água e sua influência na especiação e biodisponibilidade de metais

A espécie química do metal encontrada no ambiente e sua consequente solubilidade ou precipitação dependem de fatores físicos e químicos, tais como temperatura, pH, alcalinidade, salinidade e dureza. A presença de quelantes no ambiente também interfere na solubilidade dos metais. Os quelantes são moléculas às quais os metais se ligam formando complexos. Um

exemplo clássico de molécula quelante é o sal de EDTA, muito usado em meios de cultura de diferentes organismos. Os principais quelantes naturais presentes em águas naturais são os ácidos húmicos e fúlvicos, que funcionam como bons complexadores orgânicos de metais. Íons orgânicos também podem afetar a especiação e a disponibilidade dos metais, formando precipitados. Fosfato, cloreto, arsenato e sulfato causam a precipitação de metais traço essenciais, diminuindo a disponibilidade para os organismos. O cloreto (Cl^-) é um dos principais formadores de complexos inorgânicos no ambiente, em especial no ambiente marinho. Sendo assim, mesmo quando encontrado em pequenas concentrações (i.e. 0,01 M), ele complexa metais, gerando espécies metálicas na forma de cloretos.

Desta maneira, é importante que se conheça as características físicas e químicas da água para que se compreenda o comportamento dos metais no ambiente aquático. Com relação ao pH, sabe-se que ele exerce importante influência sobre a especiação dos metais, pois determina o grau de hidrólise, polimerização, agregação e precipitação. Desta maneira, o pH pode exercer influência sobre a desprotonação do carbono orgânico dissolvido (COD) e modificar a formação de complexos metal-COD. A dissociação dos metais também pode ser inversamente afetada pelos níveis de pH do meio, de modo que em ambientes com baixo pH ocorre um aumento da dissociação de metais, elevando as concentrações de suas formas iônicas no meio. A especiação química do cobre, por exemplo, é altamente dependente do pH e também da concentração de carbonato. Em um ambiente de água doce, com pH de aproximadamente 7,6, 24% do cobre total se apresenta na forma de íon cúprico (Cu^{2+}). A uma redução do pH para 6, cerca de 90% da concentração total de cobre pode estar sob a forma de Cu^{2+} . No entanto, a concentração de carbonatos no meio pode influenciar fortemente esta relação, pois o cobre forma complexos com os íons carbonato.

As alterações das propriedades físico-químicas de um sistema aquático frente à acidez dependem da capacidade tampão da água, conhecida como alcalinidade, que é determinada pelas características geológicas do meio. Os íons CO_3^{2-} , HCO_3^- e OH^- são os principais responsáveis pela alcalinidade, sendo que fosfatos, boratos e silicatos também contribuem. A alcalinidade é mais importante em ambientes que apresentam maior força iônica, visto que a concentração de espécies carbonatadas aumenta com o incremento da salinidade, gerando maiores concentrações de complexos de ânions com metais.

A salinidade também pode influenciar na especiação dos metais, especialmente em ambientes salobros e marinhos, pois reflete a concentração de sais que existe em uma determinada massa d'água. Os ânions formam complexos com os metais, reduzindo assim a sua biodisponibilidade. Além disso, os cátions em alta concentração podem competir com

agentes complexantes dos metais, reduzindo assim a disponibilidade de seus sítios de ligação, alterando a concentração de espécies metálicas livres.

Em ambientes dulcícolas, a dureza é um fator de elevada importância para o estudo da especiação dos metais. Ela reflete as concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} presentes no meio. O Ca^{2+} e o Mg^{2+} são cátions metálicos divalentes e por isso incapazes de se complexarem com outros metais. Contudo, associada a outros fatores, tais como alcalinidade e matéria orgânica dissolvida, a dureza, assim como a salinidade, pode alterar a especiação, pois diminui indiretamente a capacidade de especiação dos metais por competirem por ligantes orgânicos e inorgânicos carregados negativamente no ambiente.

Quanto à temperatura, sabe-se que ela está inversamente relacionada com a solubilidade dos compostos químicos na água. Um dos melhores exemplos desse efeito é a concentração de oxigênio dissolvido no meio que aumenta com o aumento da solubilidade e a diminuição da temperatura.

Os compostos orgânicos dissolvidos na água possuem grandes quantidades de grupamentos fenólicos e carboxílicos, os quais apresentam alta afinidade pelos metais. Desta forma, eles podem influenciar a especiação dos metais, alterando a sua biodisponibilidade. Diversos estudos consideram que a complexação dos metais formam espécies menos disponíveis para os organismos aquáticos. Porém, sabe-se que nem todo metal complexado está biologicamente indisponível. Há casos onde o metal complexado a ligantes orgânicos lipofílicos podem passivamente se difundir através da membrana celular e, portanto, entrar facilmente na célula, causando efeitos tóxicos. No entanto, sabe-se que a maioria das moléculas orgânicas dissolvidas em ambientes aquáticos dulcícolas são compostas pelas substâncias húmicas. Estas, por sua vez, formam complexos altamente estáveis e de alta massa molecular com metais, tornando-se menos assimiláveis pelas membranas biológicas.

4. Biodisponibilidade e toxicidade de metais para os organismos aquáticos

De acordo com sua atividade biológica, os metais podem ser divididos em dois grupos: metais essenciais (Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, e W), representados por aqueles que apresentam funções biológicas conhecidas e específicas; e metais não essenciais (Ag, Cd, Sn, Au, Hg, Tl, Pb, Bi e Al), sem funções biológicas definidas. Metais como Na, K, Ca e Mg são conhecidos como macronutrientes, sendo requeridos como elementos construtores do meio intracelular e, por isso, sua concentração costuma ser elevada. Já os demais, são conhecidos como micronutrientes, sendo necessários em baixíssimas concentrações, acima das quais passam a ser tóxicos. Os metais essenciais desempenham

diversos papéis no metabolismo dos seres vivos. Os elementos de transição ligam-se firmemente a macromoléculas, particularmente proteínas, e estão envolvidos em processos como catálise enzimática de hidrólise ou reações de oxidação e/ou redução. Outras funções conhecidas são os mecanismos de controle de reações, a estabilização de estruturas, a neutralização de cargas e o controle de pressão osmótica.

Certos grupos de microorganismos são capazes de crescer em concentrações elevadas de metais, como resultado do desenvolvimento de mecanismos específicos de resistência. A tolerância pode resultar de propriedades intrínsecas do organismo, tais como membrana celular impermeável, produção de polissacarídeos extracelulares ou da simples falta de um sistema específico de transporte de metais para o interior das células. Além destes, há mecanismos de detoxificação mais elaborados, uma vez que o metal já tenha sido internalizado. No entanto, quando esses mecanismos de detoxificação não reportam as elevadas concentrações de metais no meio, ocorre um acúmulo deste no organismo, podendo induzir toxicidade.

A absorção dos contaminantes do meio externo pelos organismos, seja através de assimilação direta do meio (contaminante dissolvido na água), ou da assimilação indireta via dieta, é denominada bioacumulação. As propriedades do contaminante, bem como as características do organismo influenciam na taxa de bioacumulação dos elementos potencialmente tóxicos. Desta forma, elementos com elevada taxa de depuração e detoxificação têm menor capacidade de bioacumulação, mesmo que sua forma predominante no ambiente seja bastante disponível para assimilação. Vale lembrar aqui a influência que exercem os parâmetros físico-químicos na especiação dos metais, conforme discutido anteriormente. Além disso, devem ser considerados os efeitos destes parâmetros na fisiologia do organismo em estudo, na ausência do metal. Por fim, a acumulação e retenção de um dado elemento por um organismo é também influenciada pela concentração de ligantes presentes e da afinidade desses ligantes pelo elemento metálico. Por exemplo, alguns organismos possuem proteínas atuantes na homeostase dos micronutrientes eliminando o excesso de metais. Estas proteínas atuam pela quelação ou complexação dos metais com grupos sulfidrila, tornando o metal não reativo. A estas proteínas dá-se o nome de metalotioneínas.

De acordo com o modelo de cinética de saturação, a interação entre o metal e os sítios de ligação não segue uma resposta linear face ao aumento da concentração do metal. Se a velocidade inicial da interação é medida sobre uma escala de concentração de substrato, a velocidade de saturação aumenta com o acréscimo da concentração do metal. Todavia, a

medida que a concentração de substrato aumenta, os sítios de ligação se tornam saturados e o e o nível máximo de interação (acumulação) é atingida.

A biodisponibilidade de metais está relacionada com a fração do metal que pode ser transportada através da membrana celular dos organismos. Acredita-se que íons metálicos hidrofílicos são transportados através do transporte facilitado, enquanto um complexo metálico lipossolúvel pode se difundir rapidamente através da membrana por difusão simples. Quando o metal atravessa a membrana celular e se acumula no interior da célula, este pode se combinar com organelas celulares, participando ou não das atividades metabólicas da célula. No entanto, quando esta concentração atinge níveis que não são mais tolerados pela célula, seus efeitos tóxicos começam a ser observados. Desta forma, os efeitos tóxicos podem ser considerados em função do grau de saturação dos sítios de ação no “ligante biótico” pelos metais.

Atualmente, diversos estudos com organismos aquáticos demonstram que o principal ligante biótico responsável pela toxicidade dos metais dissolvidos na água é a brânquia. Isso pode ser explicado pelo fato de a brânquia ser o primeiro órgão de contato com a água e com os metais dissolvidos, de modo que a toxicidade dos metais está relacionada aos processos que ocorrem neste tecido, como íono e osmorregulação, respiração, e balanço ácido-base. Dentre os metais contaminantes do meio aquático, aqueles abordados no presente curso tem sido reconhecidos como tóxicos íono e/ou osmorregulatórios. Em virtude disso, as brânquias de fato passam a ser consideradas como sendo o principal órgão-alvo da toxicidade destes metais. No entanto, em organismos menores como microcrustáceos, as brânquias podem estar ausentes e a acumulação/toxicidade ocorrer em diferentes tecidos, conhecidos genericamente como ligante biótico.

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade dos metais no sistema íono e osmorregulatório dos organismos aquáticos, é importante que se compreenda os aspectos fisiológicos básicos envolvidos nestes processos. A maioria dos animais que vivem em água doce são hiperosmóticos em relação ao meio externo, ou seja, a concentração osmótica de seus fluidos corpóreos é sempre superior àquela do meio. Quando um animal é hiperosmótico em relação ao meio, a água tende a fluir osmoticamente para o interior do organismo. Os solutos, por outro lado, tendem a se difundir para o meio externo, pois a concentração osmótica interna é superior. Além disso, durante a excreção do excesso de água uma fração de solutos é conseqüentemente eliminada na urina. Para compensar estas perdas de solutos, o animal capta íons ativamente a partir do meio, sendo que as brânquias são os órgãos responsáveis pelo transporte destes íons.

As brânquias realizam o balanço iônico e osmótico através de trocas iônicas que estão intimamente associadas com a atividade de duas enzimas: a Na^+ , K^+ -ATPase e a anidrase carbônica. A Na^+ , K^+ -ATPase é encontrada em grande quantidade nas membranas basolaterais plasmáticas das células branquiais de animais aquáticos. Sua atividade está diretamente ligada ao mecanismo de transporte ativo de Na^+ e K^+ , e a manutenção do gradiente eletroquímico que permite o influxo de Na^+ do meio externo via membrana apical. Este influxo ocorre através da extrusão de prótons e consequente entrada de Na^+ , seja por meio do trocador Na^+/H^+ , seja através do canal de sódio acoplado a uma bomba protônica (Figura 1). O transporte de Cl^- também é favorecido pela geração do gradiente eletroquímico, sendo captado, por exemplo, através do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Outra enzima fundamental para o processo de osmorregulação é a anidrase carbônica, que catalisa a formação de bicarbonato e prótons a partir da hidratação do gás carbônico ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$), utilizando zinco como co-fator. Além dos prótons, utilizados na troca Na^+/H^+ , a anidrase carbônica fornece também HCO_3^- , o qual é secretado em contrapartida à assimilação de Cl^- .

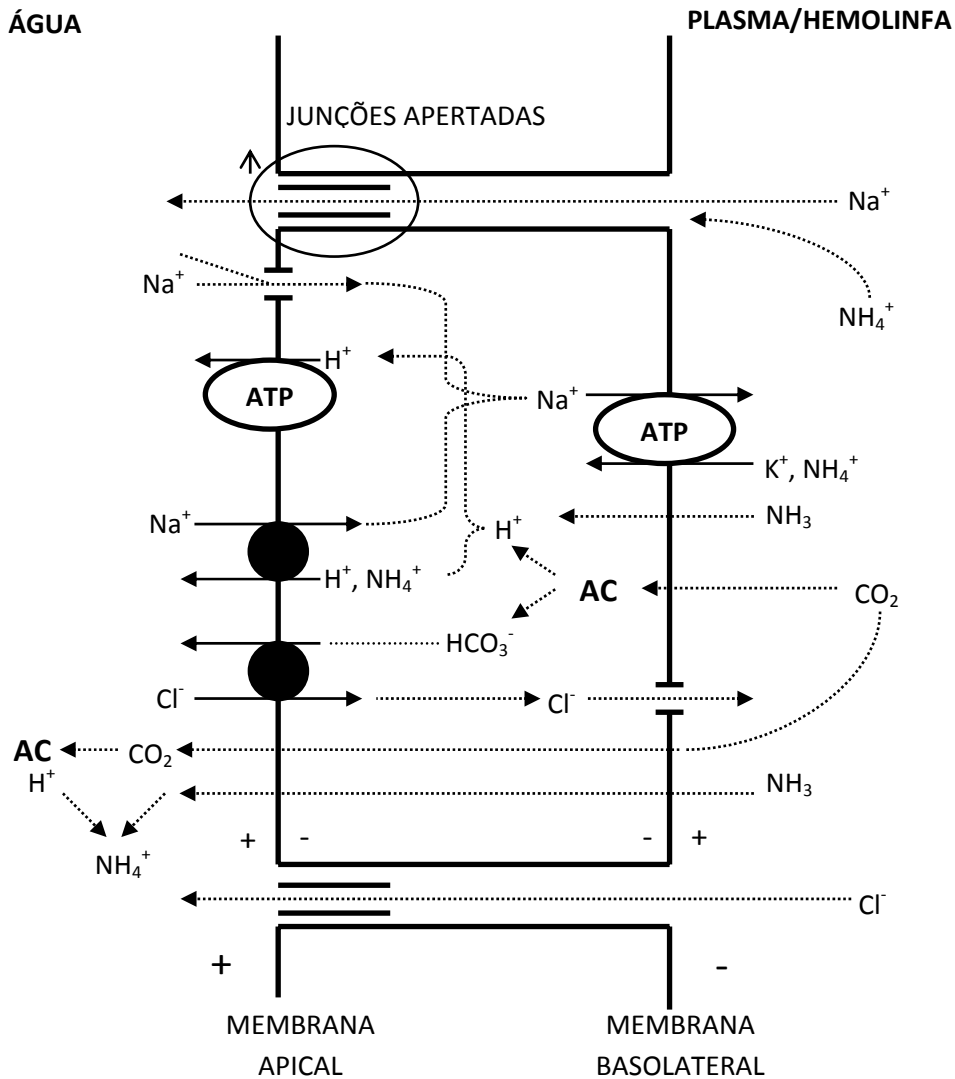


Figura 1. Modelo esquemático geral do transporte de íons através do epitélio branquial em organismos de água doce. AC = anidrase carbônica. Extraído e adaptado de Grosell *et al.* (2002).

Em função da grande importância do processo de íon e osmorregulação para os organismos aquáticos, é fácil entender que quaisquer alterações no funcionamento deste sistema poderia levar a distúrbios fisiológicos no organismo, podendo resultar em disfunções graves e até mesmo na morte do indivíduo afetado. Como já foi mencionado, distúrbios iônicos e osmorregulatórios estão entre os principais mecanismos de toxicidade de alguns metais.

A toxicidade do cobre e da prata pode ser atribuída a disfunções resultantes de interações entre o metal e estruturas celulares. As brânquias dos organismos representam o principal sítio de ação da toxicidade aguda destes elementos. Estudos prévios demonstraram que o cobre e a prata, assim como outros metais, são primariamente tóxicos ionorregulatórios. Eles atuam inibindo o influxo de sódio pela membrana apical, sendo esse processo decorrente da inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, a qual parece se dar devido à redução da ligação

entre o magnésio e a enzima. O magnésio atua como co-fator no processo de fosforilação, que resulta na função de transporte e assim permite o funcionamento da enzima. O cobre e a prata são competidores do magnésio, de modo que sua presença como poluente reduz a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, causando um desequilíbrio no processo osmorregulatório. A anidrase carbônica é outra enzima que pode ter sua atividade reduzida em função da presença de cobre, e sua inibição reduz o transporte de sódio branquial através da depleção do trocador Na^+/H^+ ou da bomba de prótons.

No entanto, além da ionorregulação/osmorregulação, a brânquia de organismos aquáticos possui diferentes funções fisiológicas, que podem também ser potencialmente afetadas pela presença de metais no meio. Como citado anteriormente, as brânquias estão envolvidas nas trocas gasosas, na regulação ácido-base e a na excreção de compostos nitrogenados. A Figura 2 apresenta um modelo esquemático dos mecanismos envolvidos no transporte iônico em brânquias de animais de água doce, mostrando as possíveis vias de entrada e os mecanismos de interação dos metais com os sítios de ação.

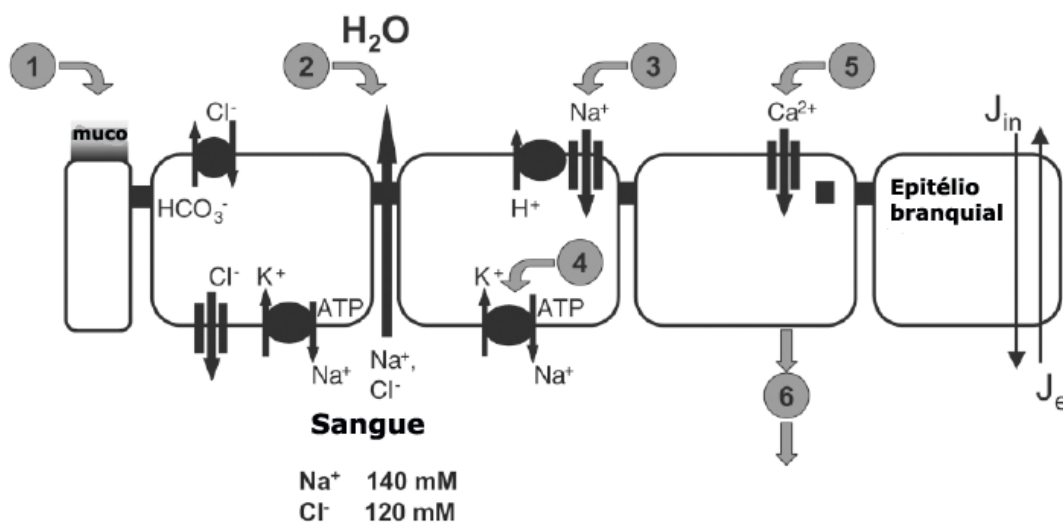


Figura 2. Diagrama esquemático ilustrando alguns mecanismos de interação de metais com sítios ativos nas brânquias de peixes, que resultam em efeitos tóxicos para estes organismos: 1- adsorção de metais resultando no desequilíbrio na transferência de gás; 2 – metais que afetam as junções comunicantes alterando o efluxo/perda de íons J_e ; 3 – metais que bloqueiam a assimilação de Na^+ (J_{in}) diretamente no sítio de transporte; 4 - metais que bloqueiam a assimilação de Na^+ (J_{in}) indiretamente através da inibição da Na^+, K^+ -ATPase; 5- metais que bloqueiam a assimilação de Ca^{2+} (J_{in}) diretamente no sítio de transporte; e 6 – metais que são absorvidos e afetam o peixe centralmente. Extraído de Paquin *et al.* (2002).

O zinco pode ser tóxico em níveis relativamente baixos. Existem dois mecanismos distintos pelo qual o zinco causa toxicidade nos organismos aquáticos. Em concentrações subletais pode causar hipocalcemia pela interferência da absorção de Ca^{2+} pelo canal de Ca^{2+}

na membrana apical. Isso ocorre pelo fato do Zn^{2+} possuir maior afinidade pelo canal de Ca^{2+} que o próprio Ca^{2+} . Ainda em concentrações subletais o zinco pode causar também a perda de Na^+ e Cl^- , bem como a inibição da anidrase carbônica nas brânquias e nas células sanguíneas. Em níveis letais, o mecanismo de toxicidade do zinco está associado à hipoxia causada por dano nas brânquias. Elevados níveis de zinco causam a separação do epitélio branquial das lamelas levando a diminuição da pressão parcial de oxigênio (pO_2) do sangue aórtico, podendo resultar em morte.

O cádmio é um dos elementos mais tóxicos aos organismos vivos. O cádmio exerce seu efeito tóxico ligando-se aos grupos sulfidrila das proteínas e provocando quebras na fita simples de DNA. O cádmio também tem afinidade pelas purinas e porfirinas, bem como pelos grupamentos hidroxila, carboxila, fosfatila, cisteinila e histidila das proteínas. Ele é capaz de interromper a fosforilação oxidativa. O cádmio compete com outros metais por sítios de ligação nas células. Devido à sua semelhança em estrutura química e comportamento com o zinco, a competição com este metal é grande. O Cd^{2+} tende, por exemplo, a ocupar o lugar no Zn^{2+} numa série de enzimas, cujo funcionamento depende do mesmo. Acredita-se que o Cd^{2+} entra na brânquia via canal de Ca^{2+} , inibindo a entrada do Zn^{2+} e do Ca^{2+} na mesma. Além disso, já se tem evidências de que o Cd^{2+} pode se complexar com compostos orgânicos formando compostos organometálicos tóxicos. A ligação com compostos orgânicos aumenta a lipofilicidade do metal, facilitando seu transporte através das membranas celulares, aumentando a gama de efeitos tóxicos causados por este elemento

4.1 Testes de Toxicidade

Para que se verifique a toxicidade de metais e outros contaminantes no meio hídrico, são realizados ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha. Atualmente, vários ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados, nacional e internacionalmente, por associações ou organizações de normalização, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), a American Society for Testing and Materials (ASTM), a American Water Work Association (AWWA), a International Organization for Standardization (ISO) e a Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD).

Os ensaios toxicológicos podem ser realizados com diferentes espécies desde que estes sejam sensíveis e ecologicamente representativas do ambiente. Quanto as propriedades físico-químicas dos metais para a realização dos ensaios, tais como pH, temperatura, oxigênio

dissolvido, dureza da água, fotoperíodo, duração do teste, entre outros devem ser padronizados. Nesses ensaios, os organismos teste são expostos à várias concentrações da amostra a ser testada (substância química, efluente, extratos aquosos) em soluções contidas nos frascos testes por determinado período de tempo. Em todos os ensaios são utilizados frascos controle, nos quais se avalia a viabilidade do lote de organismos expostos. Após o período de teste verificam-se os efeitos da amostra sobre alguns parâmetros biológicos, como mortalidade, crescimento, reprodução, comportamento dos organismos, dentre outros. Os efeitos observados são então analisados estatisticamente e os resultados são expressos em unidades numéricas, tais como CL50 (concentração letal para 50% da população testada), CE50 (concentração de efeito para 50% da população testada) e CENO (concentração máxima onde efeitos deletérios não são observados). Sendo assim, a aplicação de testes de toxicidade é fundamental para que se conheçam os níveis a partir dos quais efeitos deletérios são verificados, bem como os tipos de efeitos observados.

O conhecimento da fisiologia do animal teste e das propriedades físico-químicas do veio experimental é fundamental para se avaliar a biodisponibilidade e toxicidade dos metais em ambientes aquáticos. A relação entre estes aspectos pode ser estabelecida através do emprego de modelagem matemática que incorpora aspectos geoquímicos e fisiológicos, e permite assim uma melhor avaliação dos potenciais impactos biológicos dos metais no ambiente aquático.

5. O Modelo do Ligante Biótico (BLM)

5.1 Origem e Contexto Histórico do BLM

A presença de metais nos ambientes aquáticos é resultado da descarga de fontes pontuais e não pontuais, tanto de origem natural quanto antrópica. Com o objetivo de manter a integridade ecológica destes sistemas aquáticos, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA) estabeleceu padrões de qualidade de água (WQC – water quality criteria), ou seja, regulamentou a emissão de metais, determinando concentrações máximas que podem ser lançadas no ambiente. No entanto, a concentração de um metal não reflete necessariamente sua toxicidade para a biota aquática, uma vez que vários processos ocorrem nos ambientes aquáticos que resultam na distribuição e especiação destes elementos. Além disso, os testes realizados para estabelecer os padrões de qualidade são geralmente realizados em condições que não são representativas do ambiente natural, e muitas vezes superestimam a toxicidade dos metais.

Para solucionar estes problemas, a US-EPA desenvolveu testes para se estimar o erro quando se extrapola as condições de laboratório para o ambiente natural. Neste caso, ‘e determinado o chamado “water effect ratio” (WER). A WER é um fator avaliado com base na execução paralela de testes de toxicidade com água de laboratório e com água do ambiente a ser testado. Desta maneira, ele leva em consideração os efeitos sítio-específicos da qualidade da água, reduzindo o erro quando os padrões de qualidade são estabelecidos. No entanto, realizar este tipo de teste envolve custos elevados, demanda excessiva de tempo, e frequentemente geram resultados não confiáveis ou de difícil interpretação.

Para prever então a influência das características da água na toxicidade de metais de uma forma mais simples e confiável, se fez necessária a geração de modelos de equilíbrio químico, onde através de cálculos matemáticos a especiação dos metais no ambiente poderia ser calculada e a toxicidade destes prevista de forma mais confiável. Por isso, nos últimos 30 anos o conhecimento sobre a influência das propriedades da água sobre a especiação e biodisponibilidade de metais vem crescendo, permitindo o desenvolvimento de vários modelos de equilíbrio químico e sua aplicação em Ecotoxicologia e Regulamentação Ambiental.

Pagenkopf e colaboradores, na década de 70, foram os pioneiros em aplicar um modelo de equilíbrio químico para explicar como a química da água afeta a especiação do cobre na água, e como esta se relaciona com a toxicidade do metal em peixes dulcícolas. A conclusão foi que duas espécies de cobre estariam mais envolvidas com a toxicidade do cobre: o íon cúprico livre (Cu^{2+}) e a espécie hidroxilada CuOH^+ .

No entanto, ainda não se conhecia à época os mecanismos exatos de como os parâmetros químicos da água estariam influenciando na especiação de metais. Em 1979, Sunda & Hansen demonstraram como a especiação do cobre é afetada pela presença de COD na água. Estes autores demonstraram que à medida que a concentração de COD aumenta na água, aumenta o número de sítios de ligação para o cobre, aumentando a formação de complexo cobre-COD, reduzindo assim a concentração das espécies biodisponíveis deste metal. Deste modo, a presença de matéria orgânica dissolvida (MOD) é um parâmetro protetor contra a toxicidade de cátions metálicos. Esta redução na toxicidade aguda do cobre reforçou a idéia de Pagenkopf e colaboradores sobre a biodisponibilidade do cobre estar relacionada à atividade das espécies livres de cobre na água.

Relacionar a atividade do metal à sua toxicidade foi um importante avanço no entendimento de como avaliar a biodisponibilidade e toxicidade de metais. No entanto, algumas outras características da água influenciam a toxicidade de metais, porém sem retirá-

los do meio. A dureza da água é um importante parâmetro protetor considerado no estabelecimento de padrões de qualidade para os metais pela US-EPA. No entanto, a dureza é baseada na concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} , que são carregados positivamente, e desta maneira não se complexam com os metais, não afetando, portanto, a especiação destes elementos. Por outro lado, eles competem com os metais por sítios de ligação em compostos carregados negativamente, e assim podem também influenciar na biodisponibilidade e toxicidade dos metais.

Sendo assim, a complexação do metal pela MOD e outras partículas carregadas negativamente, aliada a competição com outros cátions por sítios de ligação, são processos que afetam a biodisponibilidade e toxicidade do metal para a biota. No entanto, entender como estes efeitos, de modo combinado e integrado, afetam a toxicidade de metais é uma tarefa mais difícil, que depende do desenvolvimento de um modelo matemático que possa integrar e quantificar simultaneamente a influência destes vários fatores sobre a biodisponibilidade e toxicidade de metais.

Embora já se soubesse que a dureza influencia a biodisponibilidade e toxicidade de metais, o mecanismo fisiológico envolvido para explicar este fenômeno só foi verificado na década de 80, quando Pagenkopf propôs o GSIM (Gill Surface Interaction Model), um modelo que relaciona a toxicidade do cobre à entrada deste metal nas brânquias de peixes dulcícolas. No final da mesma década, foi demonstrado que a toxicidade diminui com o aumento da dureza porque os cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} competem por sítios de ligação nas brânquias, fisiologicamente ativos e carregados negativamente. Estes ligantes controlam a habilidade do peixe em regular o transporte de íons essenciais através do epitélio branquial.

Baseado nestes estudos que mostram os efeitos da dureza, bem como os efeitos similares do Na^+ e H^+ sobre a acumulação dos metais nas brânquias, Playle e colaboradores, no início da década de 90, verificaram as densidades dos sítios de ligação e suas constantes de estabilidade condicional que poderiam ser utilizadas no contexto de um modelo de equilíbrio químico para prever os efeitos interativos dos três C's que regem a acumulação e toxicidade de metais nas brânquias de peixes: a Concentração de exposição, a Competição e a Complexação.

Assim, a única lacuna que ainda restava a ser preenchida era o desenvolvimento de um modo de relacionar os níveis de acumulação do metal nas brânquias a um efeito tóxico, sendo este último o parâmetro medido em testes de toxicidade. Para preencher esta lacuna, MacRae realizou testes de toxicidade no peixe dulcícola *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), expondo-o a uma concentração constante de cobre dissolvido e modificando a concentração

de COD em cada um dos meios experimentais. Sabendo-se que a matéria orgânica complexa metais, reduzindo assim a formação de íons livres tóxicos, este autor propôs que a concentração de cobre acumulada na brânquia seria uma função da concentração de agentes complexantes no meio. Neste caso, a curva dose-resposta resultante destes experimentos mostrava uma relação entre o nível de cobre acumulado na brânquia e a mortalidade dos organismos expostos. Sendo assim, foi possível determinar, ao invés da CL50, a AL50, ou seja, a quantidade de cobre acumulado nas brânquias necessária para causar mortalidade de 50% dos indivíduos testados.

Conhecendo-se o nível previsto de acumulação de metais nas brânquias, e sabendo-se que a qualidade da água influencia a toxicidade destes elementos, a partir daí foi possível desenvolver um modelo para prever a acumulação de metais nas brânquias em função dos parâmetros físico-químicos do meio experimental (COD, alcalinidade, dureza, pH, cátions etc.). Surgiu então, o Modelo do Ligante Biótico (BLM – Biotic Ligand Model).

Autoridades reguladoras e a comunidade científica reconheceram então a importância em se considerar a biodisponibilidade do metal, ou seja, a fração passível de ser incorporada pelo organismo e causar toxicidade ao interagir com o ligante biótico, na avaliação dos impactos ecológicos causados por este grupo de contaminantes.

Portanto, o BLM surgiu da necessidade de refinar os critérios de qualidade de água para o cobre estabelecido pela US-EPA. No entanto, ele é, atualmente, de utilidade para a determinação da toxicidade aguda e especiação de metais em qualquer ambiente dulcícola. O BLM é, portanto, uma ferramenta útil para determinar a toxicidade de metais a partir da sua especiação e interação com o organismo. Neste contexto, o BLM é uma importante ferramenta para a avaliação de riscos ecológicos causados por metais.

Embora os primeiros testes para o desenvolvimento do BLM tenham sido realizados em peixes dulcícolas, atualmente vários grupos de pesquisa ao redor do mundo investem esforços na tentativa de ampliar o uso deste modelo para outros metais, outros organismos e diferentes condições ambientais.

Até o presente, o BLM está calibrado para a predição da toxicidade do cobre, zinco, cádmio e prata, em teleósteos e cladóceros dulcícolas. No entanto, as constantes de ligação de metais estão sendo determinadas para outras espécies, e ainda, a base de dados químicos e matemáticos estão sendo ajustadas para que o BLM possa ser estendido também para ambientes marinhos.

5.2 Bases Técnicas do Modelo do Ligante Biótico

O Modelo do Ligante Biótico (BLM; Fig. 3) é um programa matemático computacional desenvolvido para avaliar os efeitos ecológicos de metais em sistemas aquáticos. Ele é baseado na premissa de que existe uma forte correlação entre a concentração do metal no ou sobre o sítio ativo e sua subsequente toxicidade aguda. A toxicidade não está relacionada apenas à concentração total de metal na fase aquosa, de modo que a complexação do metal e sua interação com o sítio tóxico também são consideradas. Assim, o BLM é utilizado para prever o grau de ligação do metal no sítio de ação que leva a um nível de acumulação, o qual está relacionado à resposta toxicológica. O BLM considera ainda que a brânquia não é necessariamente o sítio ativo para a toxicidade de metais, permitindo que outros organismos aquáticos, como alguns crustáceos, que podem apresentar outro ligante biótico, possam ser incorporados ao modelo.

A Figura 3 representa um diagrama esquemático da estrutura do BLM, e mostra que a toxicidade do metal é baseada em suas formas iônicas, especialmente o íon livre, que interagem com sítios de ação fisiologicamente ativos no ligante biótico, levando a formação de um complexo tóxico metal-ligante biótico. No entanto, como já foi mencionado acima, esta toxicidade pode ser mitigada por diversos processos que ocorrem na água, como a complexação dos metais com a matéria orgânica dissolvida ou compostos inorgânicos e a competição dos metais com outros cátions pelos sítios de ligação no ligante biótico.

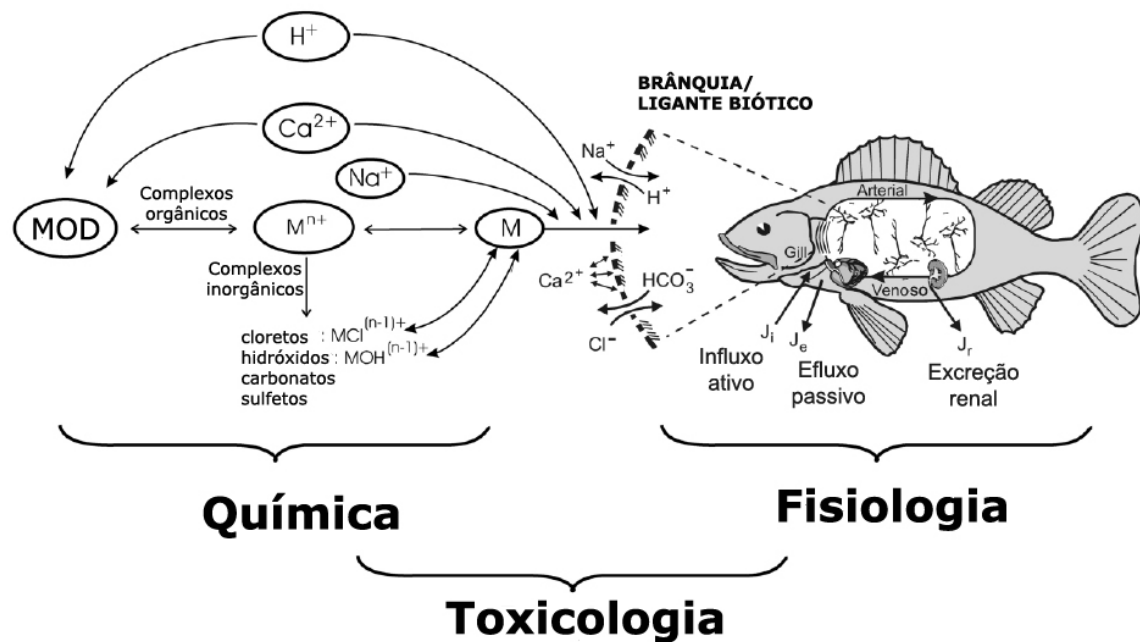


Figura 3. Representação esquemática do Modelo do Ligante Biótico (BLM), mostrando a importância dos aspectos químicos e fisiológicos para a geração de dados toxicológicos. MOD = matéria orgânica dissolvida; J corresponde ao influxo, efluxo ou excreção de sódio. Extraído de Paquin *et al.* (2002).

O Modelo do Ligante Biótico incorpora muitos elementos conceituais do GSIM e do FIAM (Free Ion Activity Model), mas é mais completo do que estes, visto que é capaz de prever os efeitos sobre um ligante biótico específico, e também por considerar a presença de matéria orgânica como agente complexante de metais e, portanto, redutora da toxicidade destes.

Muitos modelos de especiação química de metais existem, sendo que qualquer um deles poderia ter sido utilizado para o desenvolvimento da base de dados para os cálculos da especiação inorgânica dos metais em meio aquoso. No entanto, o CHESS (Chemical Equilibrium in Soils and Solutions Model) foi escolhido como base de dados inorgânicos na formulação do BLM, tendo sido modificado para incluir as interações entre o metal e a matéria orgânica presentes na versão V do WHAM (Windermere Humic Aqueous Model). Uma vez que a maioria dos ligantes inorgânicos é bem caracterizada e suas constantes de ligação conhecidas, a inserção destes parâmetros no âmbito da modelagem é uma tarefa relativamente simples. A parte difícil é modelar a complexação do metal com a matéria orgânica. Quando do desenvolvimento do BLM, o modelo mais completo de complexação orgânica era o WHAM.

O WHAM contém um modelo detalhado de ligação da matéria orgânica a prótons, que foi então estendido para incluir também a ligação de cátions metálicos. Desta maneira, sabendo-se que os prótons se ligam aos grupos carboxílicos e fenólicos da matéria orgânica, e que a quantidade de grupos fenólicos é cerca de metade da quantidade de grupos carboxílicos nos ácidos húmicos e fúlvicos, várias constantes de ionização (pK) foram determinadas para verificar a ligação entre prótons e matéria orgânica. O pK é o logaritmo negativo de K, que é a constante de ionização do ácido, ou seja, a capacidade que ele tem de doar prótons. Quanto mais forte o ácido, maior o K e menor o pK.

A relação entre a acumulação do metal e a toxicidade aguda é também um parâmetro importante no BLM, e vários estudos demonstraram que quando um peixe dulcícola é exposto ao cobre, ocorre um rápido aumento da concentração deste metal acumulado no ligante biótico nas primeiras horas de exposição, e que subsequentemente este aumento passa a ser mais gradual. Isso porque a acumulação de metais no ligante biótico segue uma curva de saturação, a qual é atingida quando todos os ligantes já estão preenchidos e a acumulação cessa mesmo que mais metal continue sendo adicionado ao meio experimental.

As primeiras versões do BLM foram desenvolvidas para o cobre e prata, através do financiamento pela Associação Internacional do Cobre (ICA) e da Kodak, respectivamente. Atualmente, estes são os metais mais utilizados, mas o modelo tem sido calibrado também

para o zinco e o cádmio. Já se tem evidências suficientes na literatura que indicam que este modelo é importante para a determinação da especiação e toxicidade do cobre e da prata em animais dulcícolas. As versões atuais do BLM para prata e cobre consideram a ligação do metal a ligantes inorgânicos e à matéria orgânica dissolvida, bem como a competição de cátions na superfície da célula. Na coluna d'água, a química de metais traços é dominada especialmente pela complexação, assimilação biológica, sorção à sólidos suspensos e reações de troca iônica. Sendo assim, o modelo considera não somente a concentração de metal lançada no ambiente, mas também muitos parâmetros químicos que reduzem as concentrações das espécies biodisponíveis do metal. Dentre estes parâmetros, destacam-se o pH, a matéria orgânica dissolvida, os sulfetos, a dureza da água, o íon Ca^{2+} , o Mg^{2+} e o Na^+ . Considerar estas interações é fundamental, uma vez que o conhecimento da biodisponibilidade é necessário para aperfeiçoar o modelo, e assim efetuar previsões mais seguras do potencial risco ambiental de muitos poluentes metálicos.

Com o desenvolvimento de modelos de especiação orgânica e inorgânica mais completos, e ainda com o conhecimento da fisiologia das membranas e constantes de assimilação de metais para diferentes organismos, novas versões do BLM podem ser desenvolvidas para ampliar sua gama de aplicações em estudos ecotoxicológicos, estabelecimento de padrões de qualidade de água sítio-específicos e avaliação de riscos ecológicos causados por metais.

6. Aplicações do BLM em Ecotoxicologia

Uma das importâncias em se estudar a toxicidade e possíveis efeitos deletérios causados por poluentes reside na necessidade de regulamentação da emissão de tais elementos nos diversos ecossistemas aquáticos e terrestres. Muitos Órgãos e Instituições envolvidas com a proteção e conservação ambiental estão empenhados em reduzir a concentração de poluentes que são lançados no ambiente, para assim manter ou restabelecer o equilíbrio dos ecossistemas. Para isso, muitos modelos matemáticos preditivos vêm sendo criados. Tais modelos são extremamente úteis, uma vez que eles constituem uma potente ferramenta na qual é possível melhorar o entendimento dos processos envolvidos na natureza, sejam eles de origem química, toxicológica ou fisiológica. Além disso, eles freqüentemente fornecem uma base quantitativa para avaliar o efeito resultante de muitas interações complexas que devem ser consideradas em sistemas naturais

No que se refere ao BLM, este modelo pode ser aplicado para uma variedade de finalidades no âmbito da Ecotoxicologia. Através da inserção das características da água, o

modelo é capaz de fornecer a distribuição das espécies metálicas no meio testado. Também, a partir da especiação química do meio, a toxicidade do metal pode ser predita sem a necessidade da execução de ensaios ecotoxicológicos. No entanto, quando testes de toxicidade são realizados e a qualidade da água conhecida, o modelo é capaz de verificar a biodisponibilidade do metal para o organismo-teste, quando se conhece as constantes de ligação do metal para a espécie testada.

Assim, o BLM pode ser utilizado para estabelecer padrões de qualidade de água, ou seja, concentrações limites de metais que podem ser lançadas no ambiente sem prejuízo à biota, para qualquer ambiente aquático, considerando-se as propriedades físico-químicas do meio e biológico da biota residente neste meio. Neste contexto, a US-EPA é a Instituição mais avançada em relação à regulamentação da emissão de metais em ambientes aquáticos, uma vez que já incorpora um modelo (BLM) para prever a biodisponibilidade e toxicidade do cobre em ambientes dulcícolas. Além disso, vários estudos estão sendo concluídos para que a emissão de outros metais também seja regulamentada utilizando esta modelagem como ferramenta.

No Brasil, a emissão de contaminantes orgânicos e inorgânicos nos ecossistemas aquáticos é regulamentada pelo Conselho Nacional do meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução nº 357 de 17 de março de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes.

As águas doces, salobras e salinas do Território Nacional são classificadas em função da qualidade de água necessária para seus usos preponderantes, e desta maneira os padrões de qualidade de água (limites máximos de emissão permitidos) são diferentes para cada uma das classes de água. Considerando os corpos de água doce do Brasil, estes são classificados em Classe Especial, representada pelas áreas de preservação ambiental, onde o despejo de contaminantes é proibido em quaisquer níveis, e em Classes 1, 2, 3 e 4, sendo que quanto maior a Classe considerada, menos restrita é a emissão de contaminantes.

Com relação aos metais, a emissão destes compostos nos ambientes aquáticos está regulamentada com base em valores do metal na fase dissolvida que podem ser encontrados no ambiente. A proposta atual do Poder Público é que se realizem ensaios ecotoxicológicos em organismos padronizados para comprovar a ausência de efeitos (agudos ou crônicos, dependendo do enquadramento do ambiente testado nas diferentes Classes de Água) sobre os organismos mais sensíveis do ambiente. Embora a Legislação esteja avançando com relação à proteção da vida aquática, o Poder Público ainda estabelece padrões de qualidade baseando-se

em valores de agências regulatórias internacionais. Além disso, os testes de toxicidade empregados são realizados somente com uma ou duas espécies, muitas vezes não representativas do ambiente natural. Por fim, ainda não existe um modelo, como o BLM, inserido no contexto de regulamentação ambiental. A modelagem dos parâmetros físico-químicos da água no âmbito do BLM poderia reduzir os gastos e o tempo necessários para realização de diversos testes, e ainda assim prever de maneira confiável a biodisponibilidade e a toxicidade de metais para a biota aquática.

O Brasil é um país com uma grande riqueza de ambientes aquáticos, seja dulcícola, salobro ou marinho, e desta forma a incorporação do Modelo do Ligante Biótico para prever a toxicidade e biodisponibilidade de metais para a biota aquática poderia ser uma etapa importante e promissora na melhoria do controle da qualidade das águas no Território Nacional.

7. Limitação do BLM e uso de modelos alternativos

As seções anteriores mostraram a importância da utilização do BLM em estudos ecotoxicológicos e iniciativas de regulamentação ambiental. No entanto, algumas limitações ainda existem na aplicação deste modelo, e muito esforço vem sendo realizado para que esta importante ferramenta possa ter seu uso ainda mais estendido. Nesta seção final, algumas limitações e perspectivas futuras do BLM serão apresentadas, bem como a utilização de um modelo de equilíbrio químico alternativo, o Visual MINTEQ, para a especiação de metais em ambientes marinhos.

Embora o BLM seja uma ferramenta muito importante para a avaliação de riscos toxicológicos de metais em água doce, sua extensão para ambientes estuarinos e marinhos é ainda controversa, em função da base de dados químicos que o modelo utiliza.

Os modelos geoquímicos utilizam a força iônica (I) e os coeficientes de atividade do metal (γ) para que a atividade do metal seja calculada. Desta forma, a força iônica é uma variável importante, sendo que as equações são confiáveis quando os parâmetros analisados se encontram dentro de uma faixa de força iônica específica. O BLM utiliza a equação de Davies, como se segue:

$$-\log \gamma_i = A \cdot z_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - B \cdot I \right)$$

Onde γ_i é o coeficiente de atividade da espécie química i , I é a força iônica, z é a carga da espécie, A é o coeficiente de Debye-Hückel (0,51 a 25°C) e B é o parâmetro B de Davies (0,3). A validade desta equação é limitada a forças iônicas baixas e intermediárias, de modo que a equação de Davies não é recomendada quando a força iônica $I > 0,3$ M. Em ambientes estuarinos e marinhos, a força iônica apresenta valores superiores a 0,4 M, e o uso da equação de Davies, portanto, deve ser evitada. No entanto, o grupo de pesquisas em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, realizou uma tentativa de validar o BLM para animais eurialinos e marinhos, e verificaram que o modelo tem potencial para ser estendido para estes ambientes, mas a base química deve ser ajustada para que o BLM englobe uma ampla faixa de forças iônicas. Atualmente, vários trabalhos estão sendo realizados no âmbito de ajustar o BLM para ambientes com alta força iônica.

Como já foi mencionado, a toxicidade de metais ocorre quando estes interagem com os ligantes bióticos do organismo-alvo, causando efeitos deletérios. No entanto, apenas uma fração do metal é incorporada pelo organismo, se liga aos sítios ativos do ligante biótico e causa toxicidade. Esta fração é constituída pelas espécies biodisponíveis do metal. De modo geral, as espécies iônicas são as que apresentam potencial tóxico. No caso do cobre, sua espécie mais tóxica é o íon cúprico (Cu^{2+}), mas algumas espécies hidroxiladas (CuOH^+ e $\text{Cu}(\text{OH})_2$) são também tóxicas aos organismos. Todas as frações tóxicas de cobre estão presentes na fase dissolvida do metal e podem ser estimadas a partir de modelagem química.

Conforme discutido anteriormente, a determinação da especiação química para a obtenção das concentrações das espécies tóxicas de metais, bem como a atividade destas espécies, é de grande importância, uma vez que as características físico-químicas do meio exercem grande influência na especiação de metais. Deve-se, portanto, conhecer as espécies metálicas que realmente estão causando toxicidade e em que níveis esta toxicidade é causada. Neste contexto, o modelo químico Visual MINTEQ é uma ferramenta bastante confiável para a determinação da especiação química de metais em uma ampla faixa de salinidade (forças iônicas).

O Visual MINTEQ é uma versão para o Windows do modelo MINTEQA2, desenvolvido, em 1999, pela US-EPA. O pacote computacional é mantido por dois conselhos de pesquisa suecos (MISTRA e VR) e sua última atualização ocorreu em 06/04/2009. Este modelo permite ao usuário optar por uma dentre três equações de correção de atividade, sendo que a equação de SIT (Specific Ion Interaction Theory) pode ser aplicada em qualquer faixa de força iônica até 4 M, conforme apresentado abaixo:

$$\log \gamma_i = -A \cdot z_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + 1,5\sqrt{I}} \right) + \sum_k \varepsilon(i, k) \cdot m_k$$

Neste caso, $\varepsilon(i, k)$ é um coeficiente de interação de espécies que determina as interações específicas entre as espécies i e k . A soma se estende para todas as espécies da solução. Quando $I < 0,2$ M, a equação de SIT apresenta valores similares aos da equação de Davies. Entretanto, em forças iônicas superiores, o termo $\sum_k \varepsilon(i, k) \cdot m_k$ torna os resultados diferentes e mais confiáveis.

Sendo assim, a partir da inserção dos parâmetros físico-químicos do meio experimental e utilizando-se a equação de SIT, é possível determinar, por meio do Visual MINTEQ, a especiação do cobre a partir das concentrações do metal dissolvido determinadas experimentalmente. Infelizmente, embora o Visual MINTEQ seja um importante modelo de especiação química, ele não considera a presença de um ligante biótico influenciando na assimilação de contaminantes pelos organismos. As constantes de ligação de metais a sítios ativos nos tecidos de organismos marinhos ainda não foram determinadas, impossibilitando, até o momento, a inserção de parâmetros fisiológicos em modelos geoquímicos desenvolvidos para ambientes salinos.

Outro importante aspecto a ser considerado é o efeito das diferentes vias de contaminação sobre a toxicidade dos metais. Visto que os organismos são expostos aos contaminantes tanto por via direta (metal dissolvido na água) quanto por via indireta (transferência trófica), testes toxicológicos considerando os efeitos subletais dos contaminantes obtidos via dieta são ecologicamente importantes. Deve ser considerado que a presença de alimento no meio experimental pode influenciar amplamente a toxicidade aguda e crônica de metais por uma modificação tanto na química da água, conforme discutido anteriormente, quanto nas rotas de acumulação do metal. Um bom exemplo disso são os estudos recentes com organismos herbívoros do zooplâncton marinho sendo troficamente expostos a baixas concentrações de metais (Ag, Hg, Cd, Zn e Sn). Nestes organismos, a taxa de produção e eclosão de ovos diminuiu aproximadamente 50% em concentrações 2-3 vezes abaixo dos valores determinados através da contaminação direta do meio. Estes efeitos podem ser visualizados como uma função da quantidade corporal de metal acumulado, caracterizando assim a resposta tóxica como uma expressão da dose interna do metal.

A assimilação de metais via dieta é ainda uma limitação ao uso do BLM. À medida que o alimento é ingerido, e juntamente com ele os metais, vários processos ocorrem no

interior do organismo, e estes poderão alterar a biodisponibilidade destes elementos para a incorporação aos sítios ativos de toxicidade. No entanto, os processos que ocorrem no interior dos organismos ainda não foram bem elucidados, tornando difícil sua modelagem e inserção no âmbito do BLM ou outros modelos de aplicação em Ecotoxicologia.

Uma outra limitação do uso do BLM é sua aplicação para determinação da toxicidade crônica de metais. As constantes de afinidade de metais nos sítios de ligação foram determinadas com base em testes de toxicidade aguda destes elementos, e por enquanto ainda não se conhece os mecanismos exatos de toxicidade crônica destes contaminantes para os organismos aquáticos. Atualmente, os padrões de qualidade considerando os potenciais efeitos crônicos dos metais ainda são derivados dos resultados obtidos em testes de toxicidade aguda.

Apesar das limitações atuais ao uso do BLM para distintas situações (ambientes salinos, contaminação via dieta, e modelagem da toxicidade crônica), cabe ressaltar que o BLM foi desenvolvido considerando-se a possibilidade de incorporação de novos parâmetros e constantes que influenciam a biodisponibilidade e a toxicidade de metais em ambientes aquáticos. Desta forma, este modelo se caracteriza como sendo o mais versátil e promissor dentre aqueles até então desenvolvidos e calibrados. Portanto, o uso do BLM nas condições limitantes apresentadas acima é apenas uma questão de tempo, dependendo somente de novos estudos que estabeleçam os parâmetros e as taxas com que eles afetam a especiação dos metais e sua interação com o ligante biótico em espécies sensíveis, nas condições apresentadas acima.

Por fim, cabe ressaltar que o BLM não é restrito a ambientes aquáticos, tendo sido desenvolvido versões deste modelo para aplicação em ambientes terrestres, considerando-se diferentes metais. Da mesma forma que para a versão aquática, a versão terrestre para o BLM já está sendo avaliada e considerada para sua aplicação no estabelecimento de padrões de qualidade por Agências Reguladoras em diversas regiões do mundo. No que concerne a versão aquática do BLM, esta já vem sendo aplicada pelas Agências Reguladoras nos EUA, Canadá, União Européia, Nova Zelândia-Austrália e Chile. Considerando o reconhecimento internacional do BLM como potente e versátil ferramenta para avaliação da biodisponibilidade e impacto biológico de metais, e a grande riqueza e diversidade de recursos hídricos no Brasil, espera-se que num futuro próximo, este modelo possa também ser reconhecido e aplicado em Território Nacional.

8. Bibliografia Consultada

- APHA – American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, 1976. Standard methods for the examination of water and wastewaters. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Arnold WR, Santore RC, Cotsifas JS, 2005. Predicting copper toxicity in estuarine and marine waters using the Biotic Ligand Model. *Mar. Poll. Bull.* 50: 1634-1640.
- ASTM, 1997. American Society for Testing and Materials. Standard Guide for conducting acute tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Designation. E: 1192-1197.
- Barcarolli IF, 2004. Mecanismos e limiares de toxicidade aguda do cobre no isópodo eurialino *Excirrolana armata* Dana, 1852 (Decapoda, Cirolanidae): Implicações para o Modelo do Ligante Biológico. Dissertação de Mestrado. FURG, Rio Grande, Brasil, 71 p.
- Beveridge TJ, Hughes MN, Lee H, Leung KT, Poole RK, Savvaidis I, Silver S, Trevors JT, 1997. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. In: RK Poole (ed.), *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, 38: 178-243.
- Bianchini, A, Bowles KC, 2002. Metal sulfides in oxygenated aquatic systems: implications for the biotic ligand model. *Comp Biochem Physiol. C* 133: 51-64.
- Bianchini A, Martins SE, Barcarolli IF, 2004. Mechanism of acute copper toxicity in euryhaline crustaceans: implications for the Biotic Ligand Model. *Int. Cong. Ser.* 1275: 189-195.
- Bianchini A, Martins SE, Pedroso MS, Said JS, Spengler A, 2003. Biotic ligand model in fresh and sea water in Brazil. In Lagos GE, Warner AEM, Sánchez M, (Eds.). *Health, environment and sustainable development*, vol. II. Proceedings of the Copper 2003, The 5th International Conference, Santiago, Chile, pp. 543-552.
- Bury NR, McGeer JC, Wood CM, 1999. Effects of altering freshwater chemistry on physiological responses of rainbow trout to silver exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:49-55.

- Castilho PC, Martins IA, Bianchini A, 2001. Gill Na^+, K^+ -ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (DECAPODA, GRAPSIDAE). J Exp Mar Biol Ecol. 256: 215-227.
- Chowdhury MJ, Baldisserotto B, Wood CM, 2005. Tissue specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 48: 381–390.
- CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, Brasil, 23 p.
- De Schampelaere KAC, Heijerick DG, Janssen CR, 2002. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting copper toxicity to *Daphnia magna*. Comp. Biochem. Physiol. 133C: 243-258.
- Di Toro DM, Allen HE, Bergmann HL, Meyer JS, Santore RC, Paquin P, 2000. The Biotic Ligand Model: A computational approach for assessing the ecological effects of copper and other metals in aquatic systems. International Copper Association, Ltd., New York. 106 p. + appendices.
- DI Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin P, Santore RS, 2001. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. Environ. Toxicol. Chem. 20 (10): 2383-2396.
- Erickson RJ, Benoit DA, Mattson VR, Nelson Jr HP, Leonard EN, 1996. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. Environ. Toxicol. Chem. 15: 181-193.
- Finney DJ, 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, Cambridge, England, 333 p.
- Förstner U, Wittmann GTW, 1981. Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, 486 p.
- Gensemer RW, Naddy RB, Stubblefield WA, Hockett R, Santore RC, Paquin P, 2002. Evaluating the role of the ion composition on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia* in very hard waters. Comp. Biochem. Physiol. C 133: 87-97.

- Grosell M, Blanchard J, Brix KV, Gerdes R, 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 84: 162-172.
- Grosell M, Nielsen C, Bianchini A, 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C: 287-303.
- Grosell M, Wood CM, 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 205: 1179-1188.
- Grosell M, Wood CM; 2001. Bronchial vs. intestinal silver uptake in the marine teleost *Parophrys vetulus*. *J. Comp. Physiol.* 171B: 585-594.
- Heath AG, 1995. Water pollution and fish physiology. Lewis Publishers, CRC Press, Florida, USA, 359 p.
- Hirose K, 2007. Metal-organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Appl. Geochem.* 22: 1636-1645.
- Hogstrand C, Wood CM, 1996. The physiology and toxicology of zinc in fish. *In*: Taylor EW (Ed.), Toxicology and aquatic pollution: Physiological, cellular and molecular approaches. Cambridge University Press, London, UK, pp. 61-84.
- HYDROQUAL, 1999. Biotic Ligand Model (BLM) User's Guide for Version a008. HydroQual. NJ.
- Janes N, Playle RC, 1995. Modelling silver binding to gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 1847-1858.
- Janssen CR, Heijerick DG, De Schamphelaere KAC, Allen HE, 2003. Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environ. Intern.* 28: 793-800.
- Jorge MB, 2009. Efeitos da matéria orgânica dissolvida na acumulação e toxicidade aguda do cobre no marisco *Mesodesma mactroides* (Mesodesmatidae). Dissertação de Mestrado. FURG, Rio Grande, Brasil, 47 p.

- Kooijman SALM, 1987. A safety factor for LC50 values allowing for differences in sensitivity among species. *Water Res.* 21: 269-276.
- Kumaraguru AK, Ramamoorthi K, 1978. Toxicity of copper to three estuarine bivalves. *Mar. Environ. Res.* 1: 43-48.
- Libes SM, 1992. An introduction to marine biogeochemistry. John Wiley & Sons, 734 p
- Ma H, Kim SD, Allen HE, Cha DK, 2002. Effect of copper binding by suspended particulate matter on toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (4): 710-714.
- MacRae RK, Smith DE, Swoboda-Colberg N, Meyer JS, Bergman HL, 1999. Copper binding affinity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) gills. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1180-1189.
- Martins SEM, 2004. Mecanismos e Limiares de Toxicidade Aguda do Cobre no Caranguejo Eurialino *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Brachyura, Grapsidae): Implicações para o Modelo do Ligante Biológico. Dissertação de Mestrado. FURG, Rio Grande, Brasil, 74 p.
- McDonald DG, Wood CM, 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. *In*: Rankin JC, Jensen FD (Eds). *Fish ecophysiology*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 295-319.
- McGeer JC, Playle RC, Wood CM, Galvez F, 2000. A physiologically based acute toxicity model for predicting the effects of waterborne silver on rainbow trout in fresh waters. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4199-4207.
- Morgan IJ, Henry RP, Wood CM, 1997. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na⁺ and Cl⁻ transport. *Aquat Toxicol* 38:145–163.
- Morgan T, 2000. The Fish Gill: Site of action for the toxic effects of waterborne copper. *Fish Physiol.* 751: 1-12.
- Newman MC, Ownby DR, Mézin LCA, Powell DC, Christensen TRL, Lerberg SB, Anderson BA, 2000. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment:

- assumptions of distribution type and sufficient number of species. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 508-515.
- Pagenkopf GK, 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: Role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17: 342-347.
- Pais I, Jones Jr JB, 1997. *The Handbook of trace elements*. St. Lucie Press, Florida. 223 p.
- Paquin P, Di Toro DI, Santore RC, Trivedi D, Wu K, 1999. A Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals: III. Application to fish and *Daphnia* exposure to silver. Integrated approach to assessing the bioavailability and toxicity of metals in surface waters and sediments. EPA-822-E-99-001. Washington, DC., U.S. Environmental Protection Agency. pp. 3-102.
- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL, Galvez F, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, McGeer JC, Naddy RB, Playle RC, Santore RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM, Wu KB, 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C: 3–35.
- Pedroso MS, Pinho GLL, Rodrigues SC, Bianchini A, 2007. Mechanism of acute silver toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*. *Aquat. Toxicol.* 82: 173-180.
- Péqueux A, 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. *J Crust. Biol.* 15 (1): 1-60.
- Pinho GLL, Pedroso MS, Rodrigues SC, Souza SS, Bianchini A, 2007. Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: Waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquat. Toxicol.* 84: 62-70.
- Playle RC, Dixon DG, Burnison K, 1993. Copper and cadmium binding to fish gills: Estimates of metal-gill stability constants and modeling of metal accumulation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2678-2687.
- Playle RC, 1998. Modeling metal interactions at fish gills. *The Sci. Total Environ.* 219: 147-163.
- Rand GM & Petrocelli SR, 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Washington, USA, Hemisphere Pub. 666 pp.

- Rodrigues SC, 2007. Influência da matéria orgânica dissolvida na toxicidade aguda e acumulação do cobre no copépode eurialino *Acartia tonsa*: Implicações para o Modelo do Ligante Biótico. Dissertação de Mestrado, FURG, RS, Brasil. 100pp.
- Salomons W, Forstner U, Mader P, 1995. Heavy metals: problems and solutions. Springer-Verlag, 412 p.
- Santore RC, Discroll CT, 1995. The CHESS model for calculating chemical equilibria in soils and solutions, chemical equilibrium and reaction models. In: LOEPPERT, R, S A.P. and S GOLDBERG. Chemical Equilibrium and Reaction Models. American Society of Agronomy, Madison, WI. pp. pp. 357-375.
- Santore RC, Di Toro DM, Paquin PR, Allen HE, Meyer JS, 2001. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. Environ Toxicol Chem. 20: 2397-2402.
- Schmidt-Nielsen K, 1996. Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente. Santos Editora, São Paulo, SP, 600 p.
- Smith DS, Bell RA, Kramer JR, 2002. Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. Comp. Biochem. Physiol. C 133: 65-74.
- Söhnel O, Novotný P, 1985. Densities of aqueous solutions of inorganic substances. Physical Sciences Data 22, Elsevier, Amsterdam, NL.
- Sunda WG, Hansen PJ, 1979. Chemical speciation of copper in river water: effect of total copper, pH, carbonate, and dissolved organic matter. In: Jenne EA (Ed.). Chemical modelling in aqueous systems. ACS Symposium Series 93, Washington DC, pp. 147-180.
- Taylor LN, Baker DW, Wood CM, McDonald DG, 2002. An in vitro approach for modelling branchial copper binding in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. C 133: 111-124.
- Tipping E, 1994. WHAM - a chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/ electrostatic model of ion-binding by humic substances. Comput. Geosci. 20: 973-1023.

- Tundisi JG, 1999. Limnologia no século XXI: perspectivas e desafios. Instituto Internacional de Ecologia, São Carlos, Brasil, 24 p.
- US-EPA, 1986. Quality criteria for water. EPA 440/5-86-001. U.S. Environmental protection agency, Washington, D.C.
- US-EPA, 2003. 2003 Draft update of ambient water quality criteria for copper. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 86 p.+appendices.
- Voelker BM, Kogut MB, 2001. Interpretation of metal speciation data in coastal waters: the effects of humic substances on copper binding as a test case. Mar. Chem. 74: 303-318.
- Wagner C, Lokke H, 1991. Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data. Water Res. 25:1237-1242.
- Walker CH, Hopkin SI, Sibly RM, Peakall DB, 2006. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, USA, 3ed, 315 p.
- Welsh PG, Skidmore JF, Spry DJ, Dixon DG, Hodson PV, Hutchinson NJ, Hickie BE, 1993. Effects of pH and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in natural waters of low alkalinity. Can. J Fish. Aquat. Sci. 50: 1356-1362.
- Wood CM, Playle R, Hogstrand C, 1999. Physiology and modeling of mechanisms of
- Wood CM, 2001. Toxic responses of the Gill. In: Schlenck D, Benson WH (Eds.). Target organs toxicity in marine and freshwater teleosts, vol. I. Taylor & Francis, London, U.K., pp. 1-89.
- Wright DA, Welbourn P, 2002. Environmental Toxicology, Cambridge University Press, UK, 630 p.
- Zagatto PA, Bertoletti E. (Eds.), 2006. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. RIMA, São Paulo, Brasil, 464 p.
- Zia S, McDonald DG, 1994. Role of the gills and gill chloride cells in metal uptake in the freshwater adapted rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51:2482-2492